

氏 名	渡 邊 俊 介
学 位 の 種 類	博士(医学)
学 位 記 番 号	甲 第 1151 号
学位授与の日付	平成30年 3 月11日
学 位 論 文 題 名	Polyphyllin D, a steroidal saponin in <i>Paris polyphylla</i> , induces apoptosis and necroptosis cell death of neuroblastoma cells 「神経芽腫培養細胞株のPolyphyllin D( <i>Paris polyphylla</i> )におけるアポトーシスとネクロトーシスについて」  Pediatric Surgery International 33(6):713-719,2017.6
指 導 教 授	鈴 木 達 也
論文審査委員	主査 教授 吉 川 哲 史 副査 教授 杉 岡 篤 教授 鈴 木 元

論文内容の要旨

【緒言】

神経芽腫は小児悪性固形腫瘍の中で脳腫瘍に次いで多い難治性癌として位置づけられている。神経芽腫の5年生存率は35%であり、遺伝学的にはMYCN (MYCN proto-oncogene, bHLH transcription factor)が悪性度、予後の指標として知られている。多くの固形悪性腫瘍はp53の遺伝子変異を示す事が知られており、神経芽腫ではp53はMYCNの直接転写標的であると報告されている。漢方の大黄に含まれるエモジンが、ヒト神経芽腫に対しp53を介したアポトーシスを誘導する報告がある。一方、ユリ科に属する漢方薬である*Paris polyphylla*の主成分であるPolyphyllin Dには、乳癌、肝癌を含む多くの腫瘍に抗腫瘍効果を示す報告がある。

【目的】

Polyphyllin Dの神経芽腫に対する抗腫瘍効果に関しては未だ報告がない。そこで我々は、Polyphyllin Dの神経芽腫に対する抗腫瘍効果についてヒト神経芽腫培養細胞株を用いて検討した。

【対象】

ヒト神経芽腫培養細胞株として、MYCN遺伝子増幅を認める細胞(IMR-32及びLA-N-2)、MYCN遺伝子増幅を認めない細胞(NB-69)を用いた。

【方法】

Polyphyllin Dの抗腫瘍効果はMTS-assayによるcell-viabilityで評価した。次に抗腫瘍効果のメカニズムを検証するため、アポトーシスに関与するとされるカスパーゼ活性を測定した。カスパーゼ活性を認めないヒト神経芽腫培養細胞株では、ネクロトーシスに関与す

るRIPK3の特異的阻害剤を加えMTS-assayを行った。

【結果】

Polyphyllin Dを加え培養した結果、全細胞株でPolyphyllin Dの濃度依存性にcell-viabilityの低下を認めた。MYCN遺伝子増幅を認める細胞のPolyphyllin DのIC50を示す濃度は、MYCN遺伝子増幅を認めない細胞に比べ高値であった。次にカスパーゼ活性を測定した結果、MYCN遺伝子増幅を認める細胞ではカスパーゼ活性を認めなかったが、MYCN遺伝子増幅を認めない細胞ではアポトーシスに関与するカスパーゼ3/7、8が関与している可能性が示唆された。MYCN遺伝子増幅を認める細胞にPolyphyllin Dとネクロトーシスに関与する特異的阻害剤を加えた結果、Polyphyllin Dによる細胞死が抑制された。

【考察】

ヒト神経芽腫培養細胞株に対するPolyphyllin Dの抗腫瘍効果は、MYCN遺伝子増幅の有無によりその強度が異なる可能性があり興味深い。又PolyphyllinDの神経芽腫培養細胞株に対する細胞障害の機序は、全てRIPK1、RIPK3及びカスパーゼ8で構成された複合体による経路が関与していると考えられる。MYCN遺伝子増幅を認めない細胞ではアポトーシスが惹起され、MYCN遺伝子増幅を認める細胞ではネクロトーシスが惹起されたと考えられた。MYCN遺伝子増幅の有無と細胞死機序との関連については更なる検討を要する。

【結語】

本研究によりPolyphyllin Dは神経芽腫に対して抗腫瘍効果を示す事がはじめて確認された。さらに、その抗腫瘍効果は神経芽種において予後不良因子とされるMYCN遺伝子の増幅の有無と相関している可能性が示唆された。MYCN遺伝子増幅を認める神経芽腫培養細胞株に対しアポトーシスとネクロトーシスの作用の制御を図る事でPolyphyllin Dの抗腫瘍効果を増強できる可能性もあると考えられ、今後さらなる検討を行う予定である。

論文審査結果の要旨

本研究は、ヒト神経芽腫培養細胞に対するPolyphyllin Dのin vitroでの抗腫瘍効果を初めて報告したものである。神経芽腫はMYCN遺伝子増幅の有無により、臨床上の悪性度および予後が異なることが知られているが、本研究では神経芽腫培養細胞に対するPolyphyllin Dの抗腫瘍効果が、MYCN遺伝子増幅の有無によりその強度に差があることを明らかにした。また、その腫瘍細胞死のメカニズムとして、従来他の癌腫で報告されていたアポトーシスのみでなくネクロトーシスも関与している可能性、さらにその差異がMYCN遺伝子増幅の有無と関連を示唆する点が非常に興味深い。学位論文審査委員会では、MYCN遺伝子増幅とp53遺伝子との関係、Polyphyllin Dの作用機序に関する質疑を行うとともに、研究に用いた培養細胞株の妥当性、論文に掲載された図表以外の裏付けとなる実験結果の確認もなされ、研究計画の妥当性、研究結果の正確性も確認された。以上、本研究はヒト神経芽腫培養細胞に対するPolyphyllin Dの抗腫瘍効果と、MYCN遺伝子増幅の有無による細胞死のメカニズムの差異という新しい知見を発見した研究であり、論文は日本小児外科学会の欧文機関誌であるPediatric Surgery International(IF 1.18)にも掲載されており、学位論文として十分な内容と評価した。